



Figure 1

Pfu	MILD	V	D	X	I	T	E	G	K	P	V	I	R	L	F	K	K	E	N	G	X	F	K	I	E	H	D	R	T	F	R	P	Y	I	A	L	L	R	D	S	K	I	E	V	X	K	I	T	G	E	R	H	G							
DeepVent	MILD	A	D	Y	I	T	E	D	G	K	P	I	I	R	I	F	K	K	E	N	G	X	F	K	V	E	Y	D	R	N	F	R	P	Y	I	A	L	L	K	D	S	Q	I	D	E	V	X	K	I	T	A	E	R	H	G					
Hybrid_design	MILD	X	D	Y	I	T	E	X	G	K	P	X	I	R	X	F	K	K	E	N	G	X	F	K	X	E	X	D	R	X	F	R	P	Y	I	A	L	L	X	D	D	S	X	I	X	E	V	X	K	I	T	X	E	R	H	G				
Pfu	K	I	V	R	I	V	D	V	E	K	V	E	K	K	F	L	G	K	P	T	I	V	W	K	L	Y	L	E	H	P	Q	D	V	P	T	I	R	E	K	V	R	E	H	P	A	V	V	D	I	F	E	Y	D	I	P	F	A	K	R	Y
DeepVent	K	I	V	R	I	I	D	A	E	K	V	R	K	K	F	L	G	R	P	I	E	V	W	R	L	Y	F	E	H	P	Q	D	V	P	A	I	R	D	K	I	R	E	H	S	A	V	I	D	I	F	E	Y	D	I	P	F	A	K	R	Y
Hybrid_design	K	I	V	R	I	X	D	X	E	K	V	X	K	K	F	L	G	X	P	T	X	V	W	X	L	X	X	E	H	P	Q	D	V	P	X	I	R	X	K	X	R	E	H	X	A	V	X	D	I	F	E	Y	D	I	P	F	A	K	R	Y
Pfu	L	I	D	K	G	L	I	P	M	E	G	E	E	E	L	K	I	L	A	F	D	I	E	T	L	Y	H	E	G	E	E	F	G	K	C	P	I	I	M	I	S	Y	A	D	E	N	E	A	K	V	I	T	W	K	N	I	D	L	P	Y
DeepVent	L	I	D	K	G	L	I	P	M	E	G	D	E	E	L	K	L	L	A	F	D	I	E	T	L	Y	H	E	G	E	E	F	A	K	C	P	I	I	M	I	S	Y	A	D	E	E	A	K	V	I	T	W	K	N	I	D	L	P	Y	
Hybrid_design	L	I	D	K	G	L	I	P	M	E	G	X	E	E	L	K	X	L	A	F	D	I	E	T	L	Y	H	E	G	E	E	F	X	K	C	P	I	I	M	I	S	Y	A	D	E	X	E	A	K	V	I	T	W	K	N	I	D	L	P	Y
Pfu	V	E	V	S	S	E	R	E	M	I	K	R	F	L	K	V	I	I	R	E	K	D	P	D	I	I	V	T	A	N	G	D	S	F	D	F	P	Y	L	A	K	R	A	E	K	L	G	I	K	L	T	I	G	R	D	G	S	E	P	K
DeepVent	V	E	V	S	S	E	R	E	M	I	K	R	F	L	K	V	I	I	R	E	K	D	P	D	V	I	I	T	A	N	G	D	S	F	D	L	P	Y	L	V	K	R	A	E	K	L	G	I	K	L	P	L	G	R	D	G	S	E	P	K
Hybrid_design	V	E	V	S	S	E	R	E	M	I	K	R	F	L	X	X	I	I	R	E	K	D	P	D	X	I	X	T	A	N	G	D	S	F	D	X	P	Y	L	X	K	R	A	E	K	L	G	I	K	L	X	X	G	R	D	G	S	E	P	K
Pfu	M	Q	R	I	G	D	M	T	A	V	E	V	K	G	R	I	H	F	D	L	Y	H	V	I	T	R	T	I	N	L	P	T	I	E	A	V	E	A	I	F	G	K	P	K	E	K	V	Y	A	D	E	I	A	K	A	W	E			
DeepVent	M	Q	R	I	G	D	M	T	A	V	E	I	K	G	R	I	H	F	D	L	Y	H	V	I	R	R	T	I	N	L	P	T	I	E	A	V	E	A	I	F	G	K	P	K	E	K	V	Y	A	H	E	I	A	E	A	W	E			
Hybrid_design	M	Q	R	X	G	D	M	T	A	V	E	X	K	G	R	I	H	F	D	L	Y	H	V	I	X	R	T	I	N	L	P	T	I	E	A	V	E	A	I	F	G	K	P	K	E	K	V	Y	A	X	E	I	A	X	A	W	E			
Pfu	S	G	E	N	L	E	R	V	A	K	Y	S	M	E	D	A	K	A	T	Y	E	L	G	K	E	F	L	P	M	E	I	Q	L	S	R	L	V	G	Q	P	L	W	D	V	S	R	S	S	T	G	N	J	V	E	W	F	L	R	K	
DeepVent	T	G	K	G	L	E	R	V	A	K	Y	S	M	E	D	A	K	V	T	Y	E	L	G	R	E	F	F	P	M	E	A	Q	L	S	R	L	V	G	Q	P	L	W	D	V	S	R	S	S	T	G	N	J	V	E	W	F	L	R	K	
Hybrid_design	X	G	X	L	E	R	V	A	K	Y	S	M	E	D	A	K	X	T	Y	E	L	G	X	E	F	X	P	M	E	X	Q	L	S	R	L	V	G	Q	P	L	W	D	V	S	R	S	S	T	G	N	J	V	E	W	F	L	R	K		
Pfu	A	V	E	R	N	E	L	A	P	N	K	P	S	E	E	E	Y	Q	R	R	L	R	E	S	Y	T	G	G	F	V	K	E	P	E	K	G	L	W	E	N	I	V	Y	L	D	E	R	A	L	Y	P	S	I	T	H	N	V	S		
DeepVent	A	V	E	R	N	E	L	A	P	N	K	P	D	E	R	E	Y	E	R	R	L	R	E	S	Y	A	G	G	Y	V	K	E	P	E	K	G	L	W	E	G	L	V	S	L	D	E	R	S	L	Y	P	S	I	T	H	N	V	S		
Hybrid_design	A	V	E	R	N	E	X	A	P	N	K	P	X	E	X	E	Y	X	R	R	L	R	E	S	Y	X	G	G	X	Y	V	K	E	P	E	K	G	L	W	E	X	X	V	X	X	L	D	E	R	X	L	Y	P	S	I	T	H	N	V	S

Pfu
DeepVent
Hybrid_design

P	D	L	N	L	E	G	C	K	N	Y	D	I	A	P	Q	M	G	H	G	F	C	K	D	I	P	G	H	I	P	S	L	L	G	H	L	L	E	E	R	Q	K	E	K	E	K	K	M	K	T	K	M	K	A	S	K	D	P	A	E	K	I	L	L
P	D	L	N	L	E	G	C	R	E	X	D	V	A	P	E	V	C	H	K	F	C	K	D	F	P	G	H	I	P	S	L	L	G	H	L	L	E	E	R	Q	K	E	K	E	K	K	M	K	T	K	M	K	A	S	K	D	P	A	E	K	I	L	L
P	D	L	N	L	E	G	C	X	X	Y	D	N	A	P	X	V	G	H	K	F	C	K	D	X	P	G	H	I	P	S	L	L	G	H	L	L	E	E	R	Q	K	E	K	E	K	K	M	K	T	K	M	K	A	S	K	D	P	A	E	K	I	L	L

Pfu
DeepVent
Hybrid_design

D	Y	R	Q	K	A	I	K	L	L	A	N	S	F	Y	G	Y	G	Y	A	K	A	R	W	Y	C	K	E	C	A	E	S	V	A	W	G	R	K	Y	I	E	L	V	W	K	E	L	E	E	K	F	F	G	F	K	V	L	Y	I
D	Y	R	Q	R	A	I	K	L	L	A	N	S	Y	Y	G	Y	G	Y	A	K	A	R	W	Y	C	K	E	C	A	E	S	V	A	W	G	R	E	Y	I	E	L	V	W	K	E	L	E	E	K	F	F	G	F	K	V	L	Y	I
D	Y	R	Q	A	I	K	X	L	L	A	N	S	X	Y	G	Y	G	Y	A	K	A	R	W	Y	C	K	E	C	A	E	S	V	A	W	G	R	N	Y	I	E	L	V	W	K	E	L	E	E	K	F	F	G	F	K	V	L	Y	I

Pfu
DeepVent
Hybrid_design

D	T	D	G	L	Y	A	T	I	P	G	G	E	S	E	E	I	K	K	K	A	L	E	F	V	K	Y	I	N	S	K	I	P	G	L	L	E	L	E	Y	E	G	F	Y	K	R	G	F	F	V	T	K	K	R	Y	A	V	I	D	E
D	T	D	G	L	Y	A	T	I	P	G	A	K	P	E	E	I	K	K	K	A	L	E	F	V	D	Y	I	N	A	K	L	P	G	L	L	E	L	E	Y	E	G	F	Y	V	R	G	F	F	V	T	K	K	Y	A	L	I	D	E	
D	T	D	G	L	Y	A	T	I	P	G	X	X	X	E	E	I	K	K	K	A	L	E	F	V	K	Y	I	N	X	K	L	P	G	L	L	E	L	E	Y	E	G	F	Y	N	R	G	F	F	V	T	K	K	X	Y	A	X	I	D	E

Pfu
DeepVent
Hybrid_design

E	G	K	V	I	T	R	G	L	E	I	V	R	R	D	W	S	E	I	A	K	E	T	Q	A	R	V	L	E	T	I	L	K	H	G	D	V	E	F	A	V	R	I	V	K	E	V	I	Q	K	L	A	N	V	E	I	P	P	E	K
E	G	K	I	I	T	R	G	L	E	I	V	R	R	D	W	S	E	I	A	K	E	T	Q	A	K	V	L	E	A	I	L	K	H	G	N	V	E	E	A	V	K	I	V	K	E	V	T	E	K	L	S	K	Y	E	I	P	P	E	K
E	G	K	X	I	T	R	G	L	E	I	V	R	R	D	W	S	E	I	A	K	E	T	Q	A	X	V	L	E	X	I	L	K	H	G	X	V	E	E	A	V	X	I	V	K	E	V	X	X	K	L	X	Y	E	I	P	P	E	K	

Pfu
DeepVent
Hybrid_design

L	A	I	Y	E	Q	I	T	R	P	L	H	E	Y	K	A	I	G	P	H	V	A	V	A	K	K	L	A	A	K	G	V	A	K	I	K	P	G	M	V	I	G	Y	V	L	R	G	D	G	P	I	S	N	R	A	L	A	E	E
L	V	I	Y	E	Q	I	T	R	P	L	H	E	Y	K	A	I	G	P	H	V	A	V	A	K	R	L	A	A	R	C	V	A	K	V	R	P	G	M	V	I	G	Y	V	L	R	G	D	G	P	I	S	K	R	A	L	A	E	E
L	X	I	Y	E	Q	I	T	R	P	L	H	E	Y	K	A	I	G	P	H	V	A	V	A	K	X	L	A	A	X	C	V	A	K	X	X	P	G	M	V	I	G	Y	V	L	R	G	D	G	P	I	S	X	R	A	L	A	E	E

Pfu
DeepVent
Hybrid_design

Y	D	P	K	K	H	K	Y	D	A	E	Y	Y	I	E	N	Q	V	L	P	A	V	L	R	I	L	E	G	F	G	Y	R	K	E	D	L	R	Y	Q	K	T	R	Q	V	Q	L	T	S	W	L	N	I	K	K	S					
F	D	L	R	K	H	K	Y	D	A	E	Y	Y	I	E	N	Q	V	L	P	A	V	L	R	I	L	E	A	F	G	Y	R	K	E	D	L	R	Y	Q	K	T	K	Q	T	C	L	T	A	W	L	N	I	K	K						
X	D	X	X	K	H	K	Y	D	A	E	Y	Y	I	E	N	Q	V	L	P	A	V	L	R	I	L	E	X	F	G	Y	R	K	E	D	L	R	X	Q	K	T	X	Q	X	G	L	T	X	W	L	N	I	K	K	S	G	T	I	N	C

Pfu
DeepVent
Hybrid_design

N	H	D
---	---	---

Figure 2. Assembly of the oligonucleotides into library fragments.

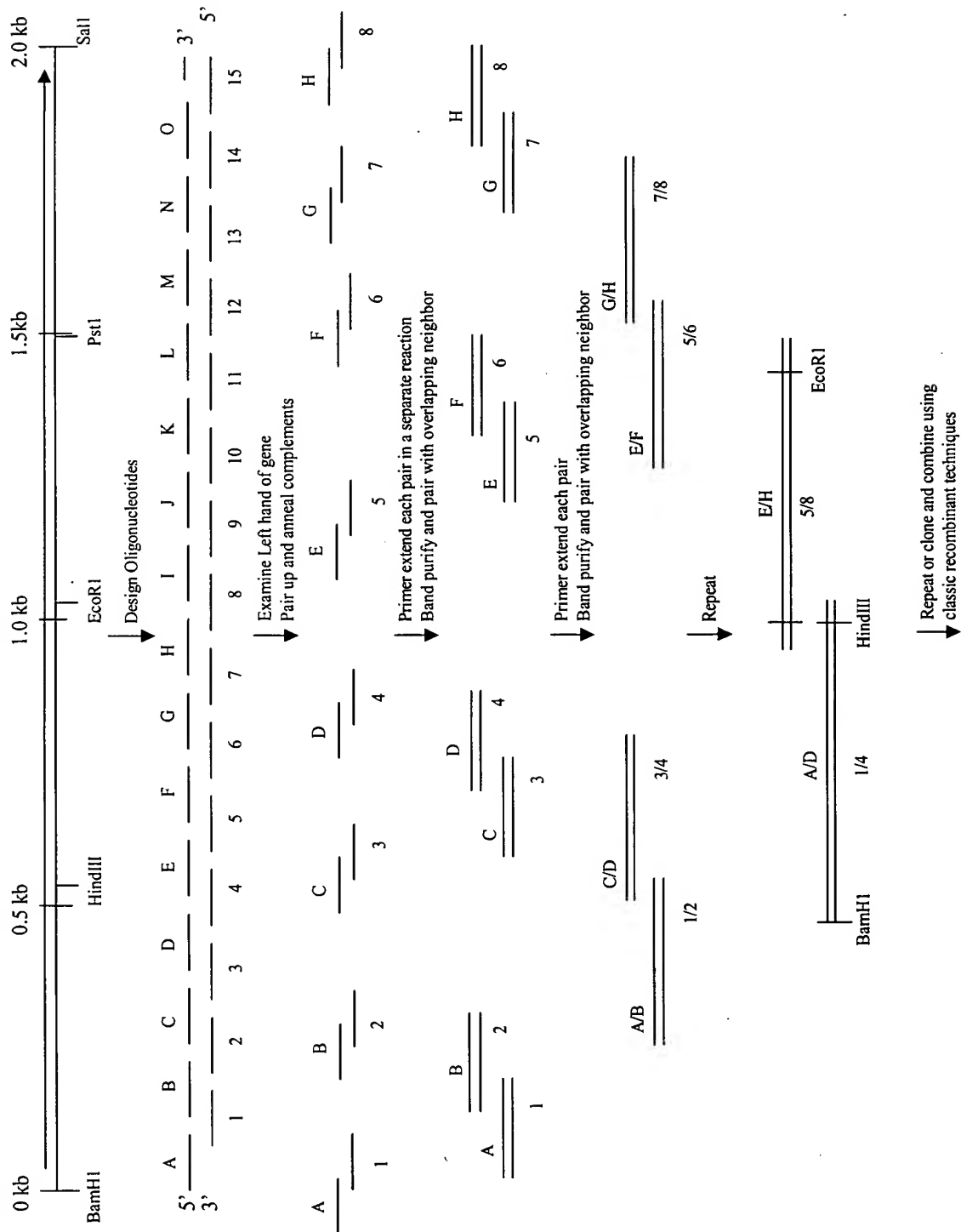


Figure 3. A comparison of the polymerase to 3' to 5' exonuclease activity

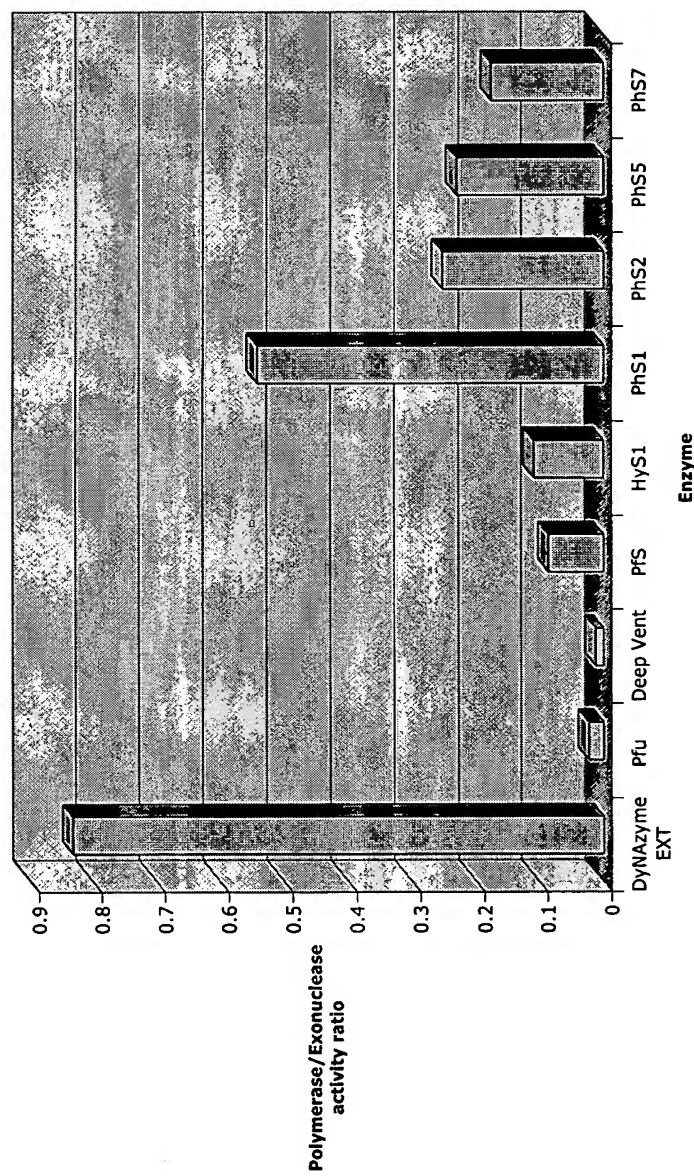


FIGURE 4

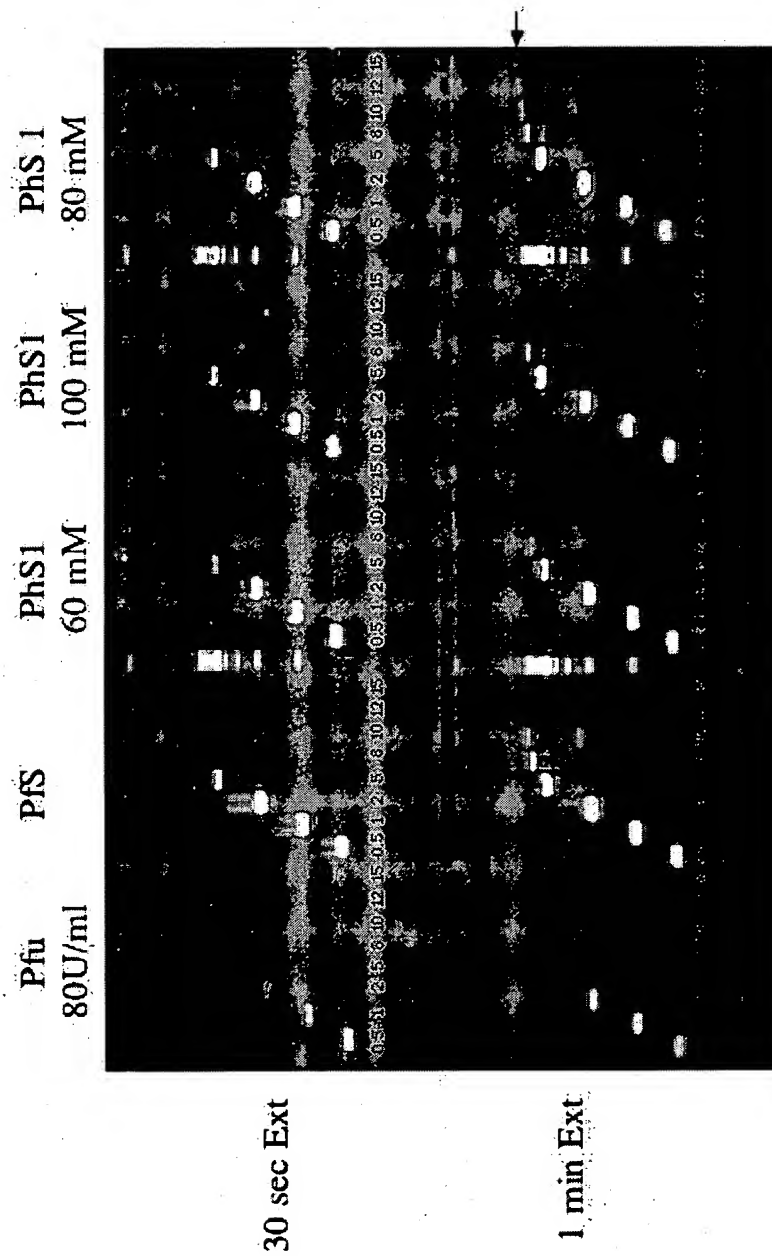


Figure 5

Pfu	M	I	L	D	V	D	Y	I	T	E	E	G	K	P	V	I	R	L	F	K	K	E	N	G	E	F	K	I	E	H	D	R	T	F	R	P	Y	I	Y	A	L	L	R	D	S	K	I	E	V	K	I	T	G	E	R	H	G				
DeepVent	M	I	L	D	A	D	Y	I	T	E	E	G	K	P	T	I	R	L	F	K	K	E	N	G	E	F	K	V	E	Y	D	R	N	F	R	P	Y	I	Y	A	L	L	K	K	D	S	K	I	E	D	E	V	R	K	I	T	A	E	R	H	G
Hybrid_design	M	I	L	D	X	D	Y	I	T	E	X	G	K	P	X	I	R	X	F	K	K	E	N	G	E	F	K	X	E	X	D	R	X	F	R	P	Y	I	Y	A	L	L	X	D	S	K	I	E	X	E	V	K	I	T	X	E	R	H	G		
HyS1	M	I	L	D	A	D	Y	I	T	E	D	G	K	P	V	I	R	L	F	K	K	E	N	G	E	F	K	I	E	Y	D	R	N	F	R	P	Y	I	Y	A	L	L	R	D	S	K	I	E	X	E	V	R	K	I	T	A	E	R	H	G	
Hyb2	M	I	L	D	A	D	Y	I	T	E	E	G	K	P	V	I	R	L	F	K	K	E	N	G	E	F	K	V	E	Y	D	R	N	F	R	P	Y	I	Y	A	L	L	E	D	S	K	I	E	D	E	V	R	K	I	T	A	E	R	H	G	
Hyb3	M	I	L	D	A	D	Y	I	T	E	E	G	K	P	V	I	R	L	F	K	K	E	N	G	E	F	K	V	E	Y	D	R	N	F	R	P	Y	I	Y	A	L	L	E	D	S	K	I	E	D	E	V	R	K	I	T	A	E	R	H	G	
Hyb4	M	I	L	D	A	D	Y	I	T	E	E	G	K	P	V	I	R	L	F	K	K	E	N	G	E	F	K	V	E	Y	D	R	N	F	R	P	Y	I	Y	A	L	L	E	D	S	K	I	E	D	E	V	R	K	I	T	A	E	R	H	G	
HyS4	M	I	L	D	A	D	Y	I	T	E	E	G	K	P	V	I	R	L	F	K	K	E	N	G	E	F	K	V	E	Y	D	R	N	F	R	P	Y	I	Y	A	L	L	E	D	S	K	I	E	D	E	V	R	K	I	T	A	E	R	H	G	
PhS1	M	I	L	D	A	D	Y	I	T	E	E	G	K	P	V	I	R	L	F	K	K	E	N	G	E	F	K	I	E	H	D	R	T	F	R	P	Y	I	Y	A	L	L	K	K	D	S	K	I	E	X	E	V	R	K	I	T	A	E	R	H	G
PhS2	M	I	L	D	V	D	Y	I	T	E	E	G	K	P	V	I	R	L	F	K	K	E	N	G	E	F	K	V	E	Y	D	R	N	F	R	P	Y	I	Y	A	L	L	K	K	D	S	K	I	E	X	E	V	R	K	I	T	G	E	R	H	G
PhS3	M	I	L	D	A	D	Y	I	T	E	E	G	K	P	T	I	R	L	F	K	K	E	N	G	E	F	K	V	E	Y	D	R	N	F	R	P	Y	I	Y	A	L	L	K	K	D	S	K	I	E	X	E	V	R	K	I	T	G	E	R	H	G
PhS4	M	I	L	D	A	D	Y	I	T	E	E	G	K	P	T	I	R	L	F	K	K	E	N	G	E	F	K	V	E	Y	D	R	N	F	R	P	Y	I	Y	A	L	L	K	K	D	S	K	I	E	X	E	V	R	K	I	T	G	E	R	H	G
PhS5	M	I	L	D	A	D	Y	I	T	E	D	G	K	P	T	I	R	L	F	K	K	E	N	G	E	F	K	V	E	Y	D	R	N	F	R	P	Y	I	Y	A	L	L	K	K	D	S	K	I	E	D	E	V	R	K	I	T	G	E	R	H	G
PhS6	M	I	L	D	A	D	Y	I	T	E	D	G	K	P	T	I	R	L	F	K	K	E	N	G	E	F	K	V	E	Y	D	R	N	F	R	P	Y	I	Y	A	L	L	K	K	D	S	K	I	E	D	E	V	R	K	I	T	A	E	R	H	G
PhS7	M	I	L	D	A	D	Y	I	T	E	D	G	K	P	T	I	R	L	F	K	K	E	N	G	E	F	K	V	E	Y	D	R	N	F	R	P	Y	I	Y	A	L	L	K	K	D	S	K	I	E	D	E	V	R	K	I	T	A	E	R	H	G

Pfu	K	I	V	R	I	V	D	V	E	K	V	E	K	K	F	L	G	K	P	I	T	V	W	K	L	Y	L	E	H	P	Q	D	V	P	T	I	R	E	K	V	R	E	H	P	A	V	V	D	I	F	E	Y	D	I	P	P	F	A	K	R	Y	
DeepVent	K	I	V	R	I	T	D	A	E	K	V	R	K	K	F	L	G	R	P	I	E	V	W	R	L	Y	F	F	E	H	P	Q	D	V	P	T	I	R	E	K	V	R	E	H	P	A	V	I	D	I	F	E	Y	D	I	P	P	F	A	K	R	Y
Hybrid_design	K	I	V	R	I	X	D	V	E	K	V	X	K	K	F	L	G	R	P	I	X	V	W	R	L	Y	X	E	H	P	Q	D	V	P	T	I	R	X	K	V	R	E	H	P	A	V	X	D	I	F	E	Y	D	I	P	P	F	A	K	R	Y	
HyS1	K	I	V	R	I	V	D	V	E	K	V	E	K	K	F	L	G	R	P	I	K	V	W	R	L	Y	F	F	E	H	P	Q	D	V	P	T	I	R	E	K	V	R	E	H	P	A	V	I	D	I	F	E	Y	D	I	P	P	F	A	K	R	Y
Hyb2	K	I	V	R	I	V	D	A	E	K	V	E	K	K	F	L	G	R	P	I	V	W	K	L	Y	F	F	E	H	P	Q	D	V	P	T	I	R	E	K	I	R	E	H	S	A	V	V	G	I	F	E	Y	D	I	P	P	F	A	K	S	Y	
Hyb3	K	I	V	R	I	V	D	A	E	K	V	E	K	K	F	L	G	R	P	I	T	V	W	K	L	Y	F	F	E	H	P	Q	D	V	P	T	I	R	E	K	I	R	E	H	S	A	V	V	G	I	F	E	Y	D	I	P	P	F	A	K	S	Y
HyS4	K	I	V	R	I	V	D	A	E	K	V	E	K	K	F	L	G	R	P	I	T	V	W	K	L	Y	F	F	E	H	P	Q	D	V	P	T	I	R	E	K	I	R	E	H	S	A	V	V	G	I	F	E	Y	D	I	P	P	F	A	K	S	Y
PhS1	K	I	V	R	I	V	D	A	E	K	V	E	K	K	F	L	G	R	P	I	T	V	W	K	L	Y	F	F	E	H	P	Q	D	V	P	T	I	R	E	K	I	R	E	H	S	A	V	V	G	I	F	E	Y	D	I	P	P	F	A	K	S	Y
PhS2	K	I	V	R	I	T	D	A	E	K	V	R	K	K	F	L	G	R	P	I	E	V	W	K	L	Y	F	F	E	H	P	Q	D	V	P	T	I	R	E	K	I	R	E	H	S	A	V	V	G	I	F	E	Y	D	I	P	P	F	A	K	S	Y
PhS3	K	I	V	R	I	V	D	A	E	K	V	E	K	K	F	L	G	R	P	I	E	V	W	K	L	Y	F	F	E	H	P	Q	D	V	P	T	I	R	E	K	I	R	E	H	S	A	V	V	G	I	F	E	Y	D	I	P	P	F	A	K	S	Y
PhS4	K	I	V	R	I	V	D	A	E	K	V	E	K	K	F	L	G	R	P	I	E	V	W	K	L	Y	F	F	E	H	P	Q	D	V	P	T	I	R	E	K	I	R	E	H	S	A	V	V	G	I	F	E	Y	D	I	P	P	F	A	K	S	Y
PhS5	K	I	V	R	I	T	D	A	E	K	V	E	K	K	F	L	G	R	P	I	T	V	W	R	L	Y	F	F	E	H	P	Q	D	V	P	T	I	R	E	K	V	R	E	H	P	A	V	I	D	I	F	E	Y	D	I	P	P	F	A	K	R	Y
PhS6	K	I	V	R	I	T	D	A	E	K	V	E	K	K	F	L	G	R	P	I	T	V	W	R	L	Y	F	F	E	H	P	Q	D	V	P	T	I	R	E	K	V	R	E	H	P	A	V	I	D	I	F	E	Y	D	I	P	P	F	A	K	R	Y
PhS7	K	I	V	R	I	T	D	A	E	K	V	E	K	K	F	L	G	R	P	I	T	V	W	R	L	Y	F	F	E	H	P	Q	D	V	P	T	I	R	E	K	V	R	E	H	P	A	V	I	D	I	F	E	Y	D	I	P	P	F	A	K	R	Y

Pfu
DeepVent
Hybrid_design

Pfu
DeepVent
Hybrid_design

Pfu	250	260	270	280	290	300
DeepVent	IGDMTAVEV	KGRIHFDL	YHVI	TRTINLP	TYTLEAV	YEAIFGKPK
Hybrid_design	IGDMTAVEV	KGRIHFDL	YHVI	TRTINLP	TYTLEAV	YEAIFGKPK
HyS1	IGDMTAVEV	KGRIHFDL	YHVI	TRTINLP	TYTLEAV	YEAIFGKPK
Hyb2	IGDMTAVEV	KGRIHFDL	YHVI	TRTINLP	TYTLEAV	YEAIFGKPK
Hyb3	IGDMTAVEV	KGRIHFDL	YHVI	TRTINLP	TYTLEAV	YEAIFGKPK
HyS4	IGDMTAVEV	KGRIHFDL	YHVI	TRTINLP	TYTLEAV	YEAIFGKPK
PhS1	IGDMTAVEV	KGRIHFDL	YHVI	TRTINLP	TYTLEAV	YEAIFGKPK
PhS2	IGDMTAVEV	KGRIHFDL	YHVI	TRTINLP	TYTLEAV	YEAIFGKPK
PhS3	IGDMTAVEV	KGRIHFDL	YHVI	TRTINLP	TYTLEAV	YEAIFGKPK
PhS4	IGDMTAVEV	KGRIHFDL	YHVI	TRTINLP	TYTLEAV	YEAIFGKPK
PhS5	IGDMTAVEV	KGRIHFDL	YHVI	TRTINLP	TYTLEAV	YEAIFGKPK
PhS6	IGDMTAVEV	KGRIHFDL	YHVI	TRTINLP	TYTLEAV	YEAIFGKPK
PhS7	IGDMTAVEV	KGRIHFDL	YHVI	TRTINLP	TYTLEAV	YEAIFGKPK

Pfu	310	320	330	340	350	360
DeepVent	SGENL	ERVAKYS	MEDAKA	TYELGKE	FFL	PK
Hybrid_design	SGENL	ERVAKYS	MEDAKA	TYELGKE	FFL	PK
HyS1	SGENL	ERVAKYS	MEDAKA	TYELGKE	FFL	PK
Hyb2	SGENL	ERVAKYS	MEDAKA	TYELGKE	FFL	PK
Hyb3	SGENL	ERVAKYS	MEDAKA	TYELGKE	FFL	PK
HyS4	SGENL	ERVAKYS	MEDAKA	TYELGKE	FFL	PK
PhS1	SGENL	ERVAKYS	MEDAKA	TYELGKE	FFL	PK
PhS2	SGENL	ERVAKYS	MEDAKA	TYELGKE	FFL	PK
PhS3	SGENL	ERVAKYS	MEDAKA	TYELGKE	FFL	PK
PhS4	SGENL	ERVAKYS	MEDAKA	TYELGKE	FFL	PK
PhS5	SGENL	ERVAKYS	MEDAKA	TYELGKE	FFL	PK
PhS6	SGENL	ERVAKYS	MEDAKA	TYELGKE	FFL	PK
PhS7	SGENL	ERVAKYS	MEDAKA	TYELGKE	FFL	PK

Pfu	370	AYERNEL	VP	APNKP	S	E	EY	Q	R	R	L	R	E	S	Y	T	G	G	F	V	K	E	P	E	K	G	L	W	E	N	I	V	Y	L	D	F	R	A	L	Y	P	S	I	I	I	T	H	N	V	S	420		
DeepVent		AYERNEL	L	APNKP	D	E	EY	E	R	R	R	L	R	E	S	Y	A	G	G	Y	V	K	E	P	E	K	G	L	W	E	N	I	V	Y	L	D	F	R	A	L	Y	P	S	I	I	I	T	H	N	V	S	410	
Hybrid_design		AYERNEL	X	APNKP	X	E	EY	X	R	R	R	L	R	E	S	Y	X	G	G	Y	V	K	E	P	E	K	G	L	W	E	N	I	V	X	Y	L	D	F	R	A	L	Y	P	S	I	I	I	T	H	N	V	S	400
HyS1		AYERNEL	V	APNKP	P	Y	E	R	R	R	L	R	E	S	Y	T	G	G	F	V	K	E	P	E	K	G	L	W	E	N	I	V	Y	L	D	F	R	A	L	Y	P	S	I	I	I	T	H	N	V	S	390		
Hyb2		AYERNEL	L	APNKP	A	E	Q	E	R	R	L	R	E	S	Y	T	G	G	F	V	K	E	P	E	K	G	L	W	E	N	I	V	Y	L	D	F	R	A	L	Y	P	S	I	I	I	T	H	N	V	S	380		
Hyb3		AYERNEL	L	APNKP	A	E	Q	E	R	R	L	R	E	S	Y	T	G	G	F	V	K	E	P	E	K	G	L	W	E	N	I	V	Y	L	D	F	R	A	L	Y	P	S	I	I	I	T	H	N	V	S	370		
HyS4		AYERNEL	L	APNKP	A	E	Q	E	R	R	L	R	E	S	Y	T	G	G	F	V	K	E	P	E	K	G	L	W	E	N	I	V	Y	L	D	F	R	A	L	Y	P	S	I	I	I	T	H	N	V	S	360		
PhS1		AYERNEL	L	APNKP	D	E	R	E	R	R	L	R	E	S	Y	A	G	G	F	V	K	E	P	E	K	G	L	W	E	N	I	V	Y	L	D	F	R	A	L	Y	P	S	I	I	I	T	H	N	V	S	350		
PhS2		AYERNEL	L	APNKP	S	E	R	E	R	R	L	R	E	S	Y	T	G	G	Y	V	K	E	P	E	K	G	L	W	E	N	I	V	Y	L	D	F	R	A	L	Y	P	S	I	I	I	T	H	N	V	S	340		
PhS3		AYERNEL	V	APNKP	S	E	E	Y	E	R	R	L	R	E	S	Y	T	G	G	Y	V	K	E	P	E	K	G	L	W	E	N	I	V	Y	L	D	F	R	A	L	Y	P	S	I	I	I	T	H	N	V	S	330	
PhS4		AYERNEL	V	APNKP	S	E	E	Y	E	R	R	L	R	E	S	Y	A	G	G	Y	V	K	E	P	E	K	G	L	W	E	N	I	V	Y	L	D	F	R	A	L	Y	P	S	I	I	I	T	H	N	V	S	320	
PhS5		AYERNEL	V	APNKP	D	E	E	E	Y	E	R	R	L	R	E	S	Y	T	G	G	Y	V	K	E	P	E	K	G	L	W	E	N	I	V	Y	L	D	F	R	A	L	Y	P	S	I	I	I	T	H	N	V	S	310
PhS6		AYERNEL	V	APNKP	D	E	E	E	Y	E	R	R	L	R	E	S	Y	T	G	G	Y	V	K	E	P	E	K	G	L	W	E	N	I	V	Y	L	D	F	R	A	L	Y	P	S	I	I	I	T	H	N	V	S	300
PhS7		AYERNEL	V	APNKP	D	E	E	E	Y	E	R	R	L	R	E	S	Y	T	G	G	Y	V	K	E	P	E	K	G	L	W	E	N	I	V	Y	L	D	F	R	A	L	Y	P	S	I	I	I	T	H	N	V	S	290

Pfu	430	PDTLN	REG	CK	N	Y	D	I	A	P	Q	V	G	H	K	F	C	K	D	I	P	G	F	I	P	S	L	L	G	H	L	L	E	E	R	Q	K	I	K	T	K	M	K	E	T	Q	D	P	I	E	K	I	L	L	480
DeepVent		PDTLN	REG	CK	N	Y	D	I	A	P	Q	V	G	H	K	F	C	K	D	I	P	G	F	I	P	S	L	L	G	H	L	L	E	E	R	Q	K	I	K	T	K	M	K	E	T	Q	D	P	I	E	K	I	L	L	470
Hybrid_design		PDTLN	REG	CK	N	Y	D	I	A	P	Q	V	G	H	K	F	C	K	D	I	P	G	F	I	P	S	L	L	G	H	L	L	E	E	R	Q	K	I	K	T	K	M	K	E	T	Q	D	P	I	E	K	I	L	L	460
HyS1		PDTLN	REG	CK	N	Y	D	I	A	P	Q	V	G	H	K	F	C	K	D	I	P	G	F	I	P	S	L	L	G	H	L	L	E	E	R	Q	K	I	K	T	K	M	K	E	T	Q	D	P	I	E	K	I	L	L	450
Hyb2		PDTLN	REG	CK	N	Y	D	I	A	P	Q	V	G	H	K	F	C	K	D	I	P	G	F	I	P	S	L	L	G	H	L	L	E	E	R	Q	K	I	K	T	K	M	K	E	T	Q	D	P	I	E	K	I	L	L	440
Hyb3		PDTLN	REG	CK	N	Y	D	I	A	P	Q	V	G	H	K	F	C	K	D	I	P	G	F	I	P	S	L	L	G	H	L	L	E	E	R	Q	K	I	K	T	K	M	K	E	T	Q	D	P	I	E	K	I	L	L	430
HyS4		PDTLN	REG	CK	N	Y	D	I	A	P	Q	V	G	H	K	F	C	K	D	I	P	G	F	I	P	S	L	L	G	H	L	L	E	E	R	Q	K	I	K	T	K	M	K	E	T	Q	D	P	I	E	K	I	L	L	420
PhS1		PDTLN	REG	CK	N	Y	D	I	A	P	Q	V	G	H	K	F	C	K	D	I	P	G	F	I	P	S	L	L	G	H	L	L	E	E	R	Q	K	I	K	T	K	M	K	E	T	Q	D	P	I	E	K	I	L	L	410
PhS2		PDTLN	REG	CK	N	Y	D	I	A	P	Q	V	G	H	K	F	C	K	D	I	P	G	F	I	P	S	L	L	G	H	L	L	E	E	R	Q	K	I	K	T	K	M	K	E	T	Q	D	P	I	E	K	I	L	L	400
PhS3		PDTLN	REG	CK	N	Y	D	I	A	P	Q	V	G	H	K	F	C	K	D	I	P	G	F	I	P	S	L	L	G	H	L	L	E	E	R	Q	K	I	K	T	K	M	K	E	T	Q	D	P	I	E	K	I	L	L	390
PhS4		PDTLN	REG	CK	N	Y	D	I	A	P	Q	V	G	H	K	F	C	K	D	I	P	G	F	I	P	S	L	L	G	H	L	L	E	E	R	Q	K	I	K	T	K	M	K	E	T	Q	D	P	I	E	K	I	L	L	380
PhS5		PDTLN	REG	CK	N	Y	D	I	A	P	Q	V	G	H	K	F	C	K	D	I	P	G	F	I	P	S	L	L	G	H	L	L	E	E	R	Q	K	I	K	T	K	M	K	E	T	Q	D	P	I	E	K	I	L	L	370
PhS6		PDTLN	REG	CK	N	Y	D	I	A	P	Q	V	G	H	K	F	C	K	D	I	P	G	F	I	P	S	L	L	G	H	L	L	E	E	R	Q	K	I	K	T	K	M	K	E	T	Q	D	P	I	E	K	I	L	L	360
PhS7		PDTLN	REG	CK	N	Y	D	I	A	P	Q	V	G	H	K	F	C	K	D	I	P	G	F	I	P	S	L	L	G	H	L	L	E	E	R	Q	K	I	K	T	K	M	K	E	T	Q	D	P	I	E	K	I	L	L	350

Pfu	490	DYRQK	AIKLL	ANS	FYGY	YG	YAK	ARWY	CKE	CAES	VT	AWGR	KYI	EL	VW	KE	LE	EE	KE	FG	FK	V	LYI	540	
DeepVent		DYRQR	AIKLI	ANS	YGY	YG	YAK	ARWY	CKE	CAES	VT	AWGR	EYI	EF	VR	KE	LE	EE	KE	FG	FK	V	LYI		
Hybrid_design		DYRQX	AIKX	ANS	YGY	YG	YAK	ARWY	CKE	CAES	VT	AWGR	X	YI	EF	VR	KE	LE	EE	KE	FG	FK	V	LYI	
HyS1		DYRQK	AIKLL	ANS	YGY	YG	YAK	ARWY	CKE	CAES	VT	AWGR	EYI	EF	VR	KE	LE	EE	KE	FG	FK	V	LYI		
Hyb2		DYRQK	AIKLL	ANS	YGY	YG	YAK	ARWY	CKE	CAES	VT	AWGR	EYI	EF	VR	KE	LE	EE	KE	FG	FK	V	LYI		
Hyb3		DYRQK	AIKLL	ANS	YGY	YG	YAK	ARWY	CKE	CAES	VT	AWGR	EYI	EF	VR	KE	LE	EE	KE	FG	FK	V	LYI		
HyS4		DYRQK	AIKLL	ANS	YGY	YG	YAK	ARWY	CKE	CAES	VT	AWGR	EYI	EF	VR	KE	LE	EE	KE	FG	FK	V	LYI		
PhS1		DYRQR	AIKLI	ANS	YGY	YG	YAK	ARWY	CKE	CAES	VT	AWGR	EYI	EF	VR	KE	LE	EE	KE	FG	FK	V	LYI		
PhS2		DYRQR	AIKLI	ANS	FYGY	YG	YAK	ARWY	CKE	CAES	VT	AWGR	EYI	EL	VR	KE	LE	EE	KE	FG	FK	V	LYI		
PhS3																									
PhS4		DYRQR	AIKLL	ANS	YGY	YG	YAK	ARWY	CKE	CAES	VT	AWGR	EYI	EF	VR	KE	LE	EE	KE	FG	FK	V	LYI		
PhS5		DYRQR	AIKLL	ANS	FYGY	YG	YAK	ARWY	CKE	CAES	VT	AWGR	EYI	EL	VR	KE	LE	EE	KE	FG	FK	V	LYI		
PhS6																									
PhS7		DYRQK	AIKLI	ANS	FYGY	YG	YAK	ARWY	CKE	CAES	VT	AWGR	KYI	EF	VR	KE	LE	EE	KE	FG	FK	V	LYI		

Pfu	550	DTDGL	YAT	IPGG	ES	EE	IK	KK	KAL	EF	V	KY	I	N	S	K	L	P	G	L	L	E	L	E	Y	E	G	F	F	V	T	K	K	R	Y	A	V	I	D	E	600
DeepVent		DTDGL	YAT	IPGG	AKK	PEE	IK	KK	KAL	EF	V	KY	I	N	A	K	L	P	G	L	L	E	L	E	Y	E	G	F	F	V	T	K	K	R	Y	A	V	I	D	E	
Hybrid_design		DTDGL	YAT	IPGG	XXX	PEE	IK	KK	KAL	EF	V	KY	I	N	X	K	L	P	G	L	L	E	L	E	Y	E	G	F	F	V	T	K	K	R	Y	A	V	I	D	E	
HyS1		DTDGL	YAT	IPGG	EE	PEE	IK	KK	KAL	EF	V	KY	I	N	S	K	L	P	G	L	L	E	L	E	Y	E	G	F	F	V	T	K	K	R	Y	A	V	I	D	E	
Hyb2		DTDGL	YAT	IPGG	EE	PEE	IK	KK	KAL	EF	V	KY	I	N	S	K	L	P	G	L	L	E	L	E	Y	E	G	F	F	V	T	K	K	R	Y	A	V	I	D	E	
Hyb3		DTDGL	YAT	IPGG	EE	PEE	IK	KK	KAL	EF	V	KY	I	N	S	K	L	P	G	L	L	E	L	E	Y	E	G	F	F	V	T	K	K	R	Y	A	V	I	D	E	
HyS4		DTDGL	YAT	IPGG	EE	PEE	IK	KK	KAL	EF	V	KY	I	N	S	K	L	P	G	L	L	E	L	E	Y	E	G	F	F	V	T	K	K	R	Y	A	V	I	D	E	
PhS1		DTDGL	YAT	IPGG	KS	EE	IK	KK	KAL	EF	V	KY	I	N	A	K	L	P	G	L	L	E	L	E	Y	E	G	F	F	V	T	K	K	R	Y	A	V	I	D	E	
PhS2		DTDGL	YAT	IPGG	KS	EE	IK	KK	KAL	EF	V	KY	I	N	S	K	L	P	G	L	L	E	L	E	Y	E	G	F	F	V	T	K	K	R	Y	A	V	I	D	E	
PhS3																																									
PhS4		DTG -	LYAT	IPGA	KS	EE	IK	KK	KAL	EF	V	KY	I	N	S	K	L	P	G	L	L	E	L	E	Y	E	G	F	F	V	T	K	K	R	Y	A	V	I	D	E	
PhS5		DTDGL	YAT	IPGG	KPEE	IK	KK	KAL	EF	V	KY	I	N	S	K	L	P	G	L	L	E	L	E	Y	E	G	F	F	V	T	K	K	R	Y	A	V	I	D	E		
PhS6																																									
PhS7		DTDGL	YAT	IPGG	KPEE	IK	KK	KAL	EF	V	KY	I	N	S	K	L	P	G	L	L	E	L	E	Y	E	G	F	F	V	T	K	K	R	Y	A	V	I	D	E		

	610	620	630	640	650	660
Pfu	EGK	VI	TR	GL	EI	VR
DeepVent	EGK	VI	TR	GL	EI	VR
Hybrid_design	EGK	VI	TR	GL	EI	VR
HyS1	EGK	VI	TR	GL	EI	VR
Hyb2	EGK	VI	TR	GL	EI	VR
Hyb3	EGK	VI	TR	GL	EI	VR
HyS4	EGK	VI	TR	GL	EI	VR
PhS1	EGK	VI	TR	GL	EI	VR
PhS2	EGK	VI	TR	GL	EI	VR
PhS3	EGK	VI	TR	GL	EI	VR
PhS4	EGK	VI	TR	GL	EI	VR
PhS5	EGK	VI	TR	GL	EI	VR
PhS6	EGK	VI	TR	GL	EI	VR
PhS7	EGK	VI	TR	GL	EI	VR

	670	680	690	700	710	720
Pfu	LA	IY	EQ	IT	RP	PL
DeepVent	LA	IY	EQ	IT	RP	PL
Hybrid_design	LA	IY	EQ	IT	RP	PL
HyS1	LA	IY	EQ	IT	RP	PL
Hyb2	LA	IY	EQ	IT	RP	PL
Hyb3	LA	IY	EQ	IT	RP	PL
HyS4	LA	IY	EQ	IT	RP	PL
PhS1	LA	IY	EQ	IT	RP	PL
PhS2	LA	IY	EQ	IT	RP	PL
PhS3	LA	IY	EQ	IT	RP	PL
PhS4	LA	IY	EQ	IT	RP	PL
PhS5	LA	IY	EQ	IT	RP	PL
PhS6	LA	IY	EQ	IT	RP	PL
PhS7	LA	IY	EQ	IT	RP	PL

Pfu
DeepVent
Hybrid_design

Pfu
DeepVent
Hybrid_design

Pfu
DeepVent
Hybrid_design

Figure 6

<i>Pfu_Mxy</i>	D Y R Q	K A I K I L I A H S P	Y G Y Y G Y A K A R W Y C K K C A L S V T A W G R	K Y I I L V W K K I I I K K I G I K V I Y I	540
<i>degreenShort_Mxy</i>	D Y R Q	R A I K I L I A H S P	Y G Y Y G Y A K A R W Y C K K C A L S V T A W G R	I Y I I L V W K K I I I K K I G I K V I Y I	
<i>Hyfins1_protein</i>	D Y R Q	X A I K X L I A H S X	Y G Y Y G Y A K A R W Y C K K C A L S V T A W G R	I Y I I L V W K K I I I K K I G I K V I Y I	
<i>Hhs1_MIE_protein</i>	D Y R Q	K A I K I L I A H S P	Y G Y Y G Y A K A R W Y C K K C A L S V T A W G R	I Y I I L V W K K I I I K K I G I K V I Y I	
<i>Hhs2_MIE_protein</i>	D Y R Q	K A I K I L I A H S P	Y G Y Y G Y A K A R W Y C K K C A L S V T A W G R	I Y I I L V W K K I I I K K I G I K V I Y I	
<i>Hhs3_MIE_protein</i>	D Y R Q	K A I K I L I A H S P	Y G Y Y G Y A K A R W Y C K K C A L S V T A W G R	I Y I I L V W K K I I I K K I G I K V I Y I	
<i>Hhs4_MIE_protein</i>	D Y R Q	K A I K I L I A H S P	Y G Y Y G Y A K A R W Y C K K C A L S V T A W G R	I Y I I L V W K K I I I K K I G I K V I Y I	
<i>Phs1_EH_protein</i>	D Y R Q	R A I K I L I A H S P	Y G Y Y G Y A K A R W Y C K K C A L S V T A W G R	I Y I I L V W K K I I I K K I G I K V I Y I	
<i>Phs2_EH_protein</i>	D Y R Q	R A I K I L I A H S P	Y G Y Y G Y A K A R W Y C K K C A L S V T A W G R	I Y I I L V W K K I I I K K I G I K V I Y I	
<i>Phs3_EH_protein</i>	D Y R Q	R A I K I L I A H S P	Y G Y Y G Y A K A R W Y C K K C A L S V T A W G R	I Y I I L V W K K I I I K K I G I K V I Y I	
<i>Phs4_EH_protein</i>	D Y R Q	R A I K I L I A H S P	Y G Y Y G Y A K A R W Y C K K C A L S V T A W G R	I Y I I L V W K K I I I K K I G I K V I Y I	
<i>Phs5_EH_protein</i>	D Y R Q	R A I K I L I A H S P	Y G Y Y G Y A K A R W Y C K K C A L S V T A W G R	I Y I I L V W K K I I I K K I G I K V I Y I	
<i>Phs6_EH_protein</i>	D Y R Q	K A I K I L I A H S P	Y G Y Y G Y A K A R W Y C K K C A L S V T A W G R	I Y I I L V W K K I I I K K I G I K V I Y I	
<i>Phs7_EH_protein</i>	D Y R Q	R A I K I L I A H S P	Y G Y Y G Y A K A R W Y C K K C A L S V T A W G R	I Y I I L V W K K I I I K K I G I K V I Y I	

**Invariable sequence element (24 aa) in hybrid proteins
 (contains nucleotide binding motif)**